

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 03-080096

(43)Date of publication of application : 04.04.1991

(51)Int.Cl. C12P 21/02
C07K 7/10
C12N 15/16
C12N 15/71
// A61K 37/24
(C12P 21/02
C12R 1:19)
C07K 99:00

(21)Application number : 01-216034

(71)Applicant : SANWA KAGAKU KENKYUSHO CO LTD

(22)Date of filing : 24.08.1989

(72)Inventor : KURONO MASATSUNE
MITANI TAKAHIKO
TAKAHASHI HARUO
TANAKA KENICHI
FUJIMURA KATSUYA
HAYASHI YUJI
KOBAYASHI YOHEI
SAWAI KIICHI

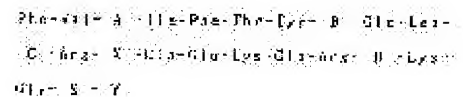
(54) PRODUCTION OF MOTILIN-LIKE POLYPEPTIDE AND RECOMBINANT DNA AND MANIFESTATION PLASMID THEREFOR

(57)Abstract:

NEW MATERIAL: A recombinant DNA bound via Met to the downstream portion of the leader sequence polypeptide having at least six non-charged polar amino acid residues, with the Met at the C-terminal and motilin-like polypeptide bound thereto. The motilin-like polypeptide is expressed by the formula (A is Pro, Gly, Asn or Ser; B is Gly, Pro, Asn or Ser; C is Gln, Glu or Asp; D is Asn, Glu or Asp; E is Gln, Lys or Arg; X is amino acid residue except Met; Y is homoserine including homoserinelactone or polypeptide made up of < 10 amino acids and containing homoserine at the C-terminal).

USE: Production of motilin-like polypeptides.

PREPARATION: DNA fragments including the base sequence coding the amino acid sequence of motilin-like gene are segmented, put to chemical synthesis, and bound.



⑩ 日本国特許庁(JP)

⑪ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A) 平3-80096

⑬ Int.Cl.⁵

識別記号

片内整理番号

⑭ 公開 平成3年(1991)4月4日

C 12 P 21/02
C 07 K 7/10C 8214-4B
8318-4H
8717-4B

C 12 N 15/00

A※

審査請求 未請求 請求項の数 5 (全 10 頁)

⑯ 発明の名称 モチリン様ポリペプチドの製法並びにそのための組換えDNA及び
発現用プラスミド

⑰ 特 願 平1-216034

⑱ 出 願 平1(1989)8月24日

⑲ 発 明 者 黒 野 昌 晴 愛知県名古屋市東区東外堀町35番地 株式会社三和化学研
究所内⑳ 発 明 者 三 谷 隆 彦 愛知県名古屋市東区東外堀町35番地 株式会社三和化学研
究所内㉑ 出 願 人 株式会社三和化学研究 愛知県名古屋市東区東外堀町35番地
所㉒ 代 理 人 弁理士 佐々木 功
最終頁に続く

明 細 書

1. 発明の名称

モチリン様ポリペプチドの製法並びにそのための
組換えDNA及び発現用プラスミド

2. 特許請求の範囲

(1) 式 (1)

Phe-Val- A -Ile-Phe-Thr-Tyr- B -Glu-Leu-
C -Arg- X -Gln-Glu-Lys-Glu-Arg- D -Lys-
Gly- E - Y〔式中 A は Pro, Gly, Asn 又は Ser を
意味し、B は Gly, Pro, Asn 又は Ser
を意味し、C は Gln, Glu 又は Asp を意
味し、D は Asp, Glu 又は Asn を意味
し、E は Gln, Lys 又は Arg を意味し、
X は Met 以外のアミノ酸残基を意味し、
Y はホモセリン (ホモセリンラクトンをも
含み、「Hse」で表す) 又は C 末端にホ
モセリンを含みアミノ酸 10 個以内の任意
のポリペプチドを意味する〕

にて示されるモチリン様ポリペプチドの製法で

-1-

あって、非電荷酸性アミノ酸を少なくとも 6 残
基有しており且つ末端にメチオニンを有している
ペプチドをコードしている一本鎖 DNA と、上記
の式 (1) にて示されるアミノ酸配列をコードし
ており、C 末端が Met である一本鎖 DNA と、
これらの一本鎖 DNA における塩基配列と相補的
な塩基配列を有している各一本鎖 DNA とをそれ
ぞれ合成し、これらの合成一本鎖 DNA を用いて
上記の非電荷酸性アミノ酸をリーダー配列として
C 末端が Met であるポリペプチドをコードして
いる二本鎖 DNA を作成し、この二本鎖 DNA の
末端に特定の制限酵素認識部位をそれぞれ付加
し、一方大腸菌内で外来遺伝子発現可能な遺伝情報
を有するベクタープラスミドを上記の両制限酵素
と同種の制限酵素で切断し、その断点に上記の両
制限酵素認識部位付き合成二本鎖 DNA を付加して
プラスミドを再構築し、この再構築プラスミドを
宿主物に取り込ませて形質転換させると共に培養
して上記の式 (1) にて示されるアミノ酸配列を
有し且つ C 末端が Met であるポリペプチドを
-2-

特開平 3-80096(2)

融合蛋白の一部として産生させ、次いで該生物を破壊させた後にプロムシアンにより処理して上記の融合蛋白から上記の式 (1) にて示されるポリペプチドを分離させ、その後に分画処理により該ポリペプチドを単離することを特徴とする、モチリン様ポリペプチドの製法。

(2) 非電荷極性アミノ酸がアスパラギン (Asn)、グルタミン (Gln)、スレオニン (Ser) 及びセリン (Ser) から選ばれたものであることを特徴とする、請求項 (1) に記載のモチリン様ポリペプチドの製法。

(3) 合成二本鎖 DNA の組込まれた再構築プラスミドを二種類の制限酵素で処理してモチリン様ポリペプチドをコードする遺伝子部分の上流域とベクター内の 1 つ所とで切断して得たフラグメントを回収し、一方上記の合成二本鎖 DNA の組込まれた同種の再構築プラスミドを二種類の制限酵素で、即ち一種類はベクター内で切断するために用いた上記と同一の制限酵素で、更にもう一種類はモチリン様ポリペプチドをコードする遺伝

-3-

子部分の下流域が上記の上流域の断点と共通となるような上記とは別の制限酵素を以て切断し、その断点に上記の切断面取られたフラグメントを DNA リガーゼによりタンデムに接合してプラスミドを再構築し、必要に応じてこのような操作を繰り返してモチリン様ポリペプチドをコードする遺伝子を 2 つ又はそれ以上組込んだプラスミドを構築し、このプラスミドを微生物に取り返させて増殖することを特徴とする、請求項 (1) 又は (2) に記載のモチリン様ポリペプチドの製法。

(4) 非電荷極性アミノ酸を少なくとも 6 残基有しているリーダー配列ポリペプチドと、このリーダー配列ポリペプチドの下流にメチオニン (Met) を介して連結されており且つ C 末端に Hse を有し式 (1) に相当するポリペプチドが連結されていることを特徴とする、モチリン様ポリペプチド製造用の組換え DNA。

(5) 非電荷極性アミノ酸を少なくとも 6 残基有しているリーダー配列ポリペプチドと、このリーダー配列ポリペプチドの下流にメチオニン

-4-

(Met) を介して連結されており且つ C 末端に Hse を有し式 (1) に相当するポリペプチドが連結されている組換え DNA が組込まれていることを特徴とする、モチリン様ポリペプチド製造用の発現用プラスミド。

3. 発明の詳細な説明

(産業上の利用分野)

本発明はモチリン様ポリペプチド、特に C 末端に Hse を有するモチリン様ポリペプチドの製法及びそのための組換え DNA 並びに発現用プラスミドに係る。

本発明によるポリペプチドは医薬として、特に消化管障害の治療に用いることができる。

(従来の技術)

モチリンは、ブラウン等によりブタの上部小腸粘膜から初めて単離され、構造の決定された物質であり、ペプチドホルモンの一種である。

["Gastroenterology" 第 62 巻第 401 - 404 頁 (1972 年) 及び "Can. J. Biochem." 第 52 巻第 7 - 10 頁 (1974 年)]、このブタモチリン

-5-

は、22 個のアミノ酸から構成されており、分子量は約 2700 である。

一方、ヒト由来のモチリンについては、本発明者等によってその cDNA クローンが単離されると共に構造決定がなされ、その結果、そのアミノ酸配列はブタ由来のものと同一であることが明らかにされた (特開昭 62-109757)。

モチリンの生理作用としては平滑筋運動亢進作用及び消化管平滑筋収縮作用が良く知られている。これらの作用の中で、消化管運動亢進作用に関しては、例えば胃における排空時間を短縮する作用が報告されており ["Gastroenterology" 第 80 巻第 456 - 460 頁 (1981 年)]、又消化管平滑筋収縮作用に関してはウサギやヒトの胃前庭部及び十二指腸に対して神経経路に依存せずに強い収縮をもたらすことが知られている。従って、モチリンは胃腸運動を亢進させ、然かも格別の副作用が報告されていないので、術後等における胃腸障害の治療や胃腸障害の診断に有効なものと考えられてきた (図に、術後における腸管麻痺等の

-6-

特開平 3-80096(3)

治療には現在プロスタグランジン等が用いられているが、副作用が強い点に問題がある}。

尚、モチリンのアミノ酸配列における 13 位はメチオニンであるが、これをロイシン又はノルロイシンに変換したアミノ酸構造を有する化学合成ポリペプチドもモチリンと同様な生理活性を示すことが報告されており["Scand. J. Gastroenterology" 第 11 巻第 119 - 203 頁 (1976 年) 等]、13 位のメチオニンは活性に及ぼす影響が殆どないものと考えられている。

更に、ヒ素様に Hse を含むモチリン様ポリペプチドもモチリンと同等又はそれ以上の生理活性を示すことが、本発明者等により明らかにされている(特願第 64 - 286 明細書)。

(発明が解決しようとする課題及び発明の目的)

慣用技術によれば、モチリンは一般にブタ由来のものであって、抽出により得られており、従って大量生産が極めて困難であった。一方、化学合成法を利用する場合にも、モチリンはアミノ酸数 22 のポリペプチドであるために、大差に且つ

-7-

製造に得ることが困難であった。即ち、モチリンは消化管障害の治療等における有効性が期待されているにも拘らず、その生産性がネックとなっており臨床治療に汎く利用されるに至っていないのであった。

それ故に、所謂「バイオテクノロジー」を応用してモチリン様活性を有するポリペプチドを廉価に製造するための研究が進められてきた(特開昭 63 - 71195 公報及び本発明者等が開発の特願昭 63 - 208006 明細書に記載の方法等)。

しかしながら、バイオテクノロジーを利用する上記の諸方法はプロムシアンを用いて切断する工程を省しており、この際に生じた C 末端の Hse を含むペプチドを酵素処理によって取り除く操作を行っており、この酵素処理工程が収率の低下やコストの増加を招き、従って実際の大量生産の場合には問題となっていた。そこで、本発明者等は鋭意研究した結果、既述のように(特願昭 64 - 286 明細書)、C 末端に Hse を有しているモチリン様ポリペプチドがモチリンと同等又はそれ以

-8-

上の生理活性を有し、従って Hse 部分の除去操作は不要であるとの認識を得るに至っている。

本発明は、最近開発されたこれらの方法を踏まえた上でなされたものであり、その本質的目的はモチリン様ポリペプチドを更に容易に製造する方法を提供することにある。

本発明の付随的な、但し重要な目的はモチリン様ポリペプチドを極めて効率的に且つ廉価に製造する方法を提供することにある。

本発明の他の目的は、上記の製造方法を実施するために用いられる新規な組換え DNA を提供することにある。

本発明の更に他の目的は、上記の組換え DNA を組込んだ発現用プラスミドを提供することにある。

(課題を解決し、目的を達成する手段および作用)

本発明によれば、上記の課題は、式 (1)

-9-

Phe-Val- A -Ile-Phe-Thr-Tyr- B -Gly-Leu-
C -Arg- X -Gln-Glu-Lys-Glu-Arg- D -Lys-
Gly- E - Y

[式中 A は Pro、Gly、Asn 又は Ser を意味し、B は Gly、Pro、Asn 又は Ser を意味し、C は Gln、Glu 又は Asp を意味し、D は Asn、Gln 又は Asp を意味し、E は Gln、Lys 又は Arg を意味し、X は Het 以外のアミノ酸残基を意味し、Y はホモセリン(ホモセリンラクトンを含む、「Hse」で表す)又は C 末端にホモセリンを含むアミノ酸 10 個以内の任意のポリペプチドを意味する]

にて示されるモチリン様ポリペプチドの製法であって、非電荷極性アミノ酸を少なくとも 6 個含有しており且つ末尾にメチオニンを有しているペプチドをコードしている一本鎖 DNA と、上記の式 (1) にて示されるアミノ酸配列をコードしており、C 末端が Het である一本鎖 DNA と、これらの一本鎖 DNA における塩基配列と相補的

-10-

-701-

特開平 3-80096(4)

な塩基配列を有している各一本鎖 DNA とをそれぞれ合成し、これらの合成一本鎖 DNA を用いて上記の非電荷塩性アミノ酸をリーダー配列として C 末端が Met であるポリペプチドをコードしている二本鎖 DNA を作成し、この二本鎖 DNA の末端に特定の制限酵素認識部位をそれぞれ付加し、一方大腸菌内で外來蛋白発現可能な遺伝情報を有するベクタープラスミドを上記の両制限酵素と同種の制限酵素で切断し、その断点に上記の制限酵素認識部位付き合成二本鎖 DNA を付加してプラスミドを再構築し、この再構築プラスミドを宿主生物に取り込ませて形質転換させると共に培養して上記の式 (1) にて示されるアミノ酸配列を有し且つ C 末端が Met であるポリペプチドを融合蛋白の一部として産生させ、次いで微生物を破壊させた後にプロムシアンにより処理して上記の融合蛋白から上記の式 (1) にて示されるポリペプチドを分離させ、その後に分画処理により該ポリペプチドを単離することを特徴とする、モチリン様ポリペプチドの製法により提供されると共に

- 11 -

からである。

本発明方法により製造されるモチリン様ポリペプチドを示す式 (1) において、13 位のアミノ酸残基である Y が Met 以外のアミノ酸残基とされているのは、この部位が Met であると、後の工程、即ち融合された融合蛋白をプロムシアンで処理する場合に 13 位の Met の部位においても切断が生じるためにモチリン様活性を有する所望のポリペプチドが得られないためである。式 (1) において Y に相当する部位である C 末端が Hse であるのは、産生された融合蛋白をプロムシアンにて処理する工程のみでモチリン様活性を有する所望のポリペプチドが得られるようになるためである。非電荷塩性アミノ酸としては、種々検討の結果、アスパラギン (Asp)、グルタミン (Gln)、スレオニン (Thr) 及びセリン (Ser) が発現率の向上をもたらす点で適していることが判明した。本発明において、このリーダー配列ペプチドにおける末尾のアミノ酸がメチオニン (Met) で構成されているのは、後の工程で、即ち

- 13 -

に、上記の主目的が達成される。

ここで、上記の式 (1) にて示されるアミノ酸配列を有し C 末端がメチオニン (Met) (プロムシアンによる切断後には Hse に変換される) であるポリペプチドを宿主生物内で且つ融合蛋白の一部として大量に産生させるには、モチリン様ポリペプチドであって C 末端がメチオニン (Met) であるポリペプチド遺伝子をタンデムに複数個接合させ、これにより重合体蛋白としてモチリン様ポリペプチドを発現させることが重要であるが、モチリン様ポリペプチド遺伝子をタンデムに複数個連結させ、発現用ベクターに組み込むこと自体については、本発明者等により既に知られているので (特願 63-208006 明細書)、この方法を利用することができる。尚、上記のモチリン様ポリペプチド部分間のアミノ酸配列は C 末端が Met であれば良い。何故ならば、Met を介して結合されているモチリン様ポリペプチドからなる重合体蛋白はプロムシアンにて処理される場合に Met 部分で切断が生じて単量体に分断される

- 12 -

プロムシアンで処理することにより、リーダー配列部分を容易に切断除去し得るようになるためである。尚、リーダー配列部分及び式 (1) にて示されるアミノ酸配列を有し C 末端が Met (プロムシアン処理により切断された後には Hse に変換) であるポリペプチドをコードする一本鎖 DNA については分割して合成することができ、これによって合成を容易ならしめることができる。

本発明による組換え DNA は、上記の説明から明らかなように、非電荷塩性アミノ酸を少なくとも 6 残基有しているリーダー配列ポリペプチドと、このリーダー配列ポリペプチドの C 末端側に上記の式 (1) にて示されるアミノ酸配列を有し C 末端が Met であるポリペプチドが連続されていることを特徴としている。この場合にも、モチリン様ポリペプチドが複数個タンデムに接合されているのが有利であり、このポリペプチドの相互間には C 末端が Met であるペプチドで連結されているのが有利である。

一方、本発明による発現用プラスミドは、上記

- 14 -

特開平 3-80096(6)

をポリヌクレオチドキナーゼでそれぞれ処理して 5' 末端を磷酸化した後に、相補的 DNA 対である式 (3) と (8)、(4) と (7) 及び (5) と (6) をそれぞれアニールさせて形成された 3 本の二本鎖 DNA を DNA リガーゼによりタンデムに接合することにより式 (2) にて示される DNA 断片を得た。

(2) 発現ベクターへの組込み

上記の第 (1) 項で得た合成 DNA 断片を、発現ベクターに組込む操作について、次に第 1 図を参照しつつ説明する。

大腸菌の Trp プロモータを有するプラスミド pTH1 に制限酵素 HindIII 及び BclI を使用させて切断し、その断点に、上記の第 (1) 項で得た合成 DNA 断片を DNA リガーゼにより、Trp プロモータを有する大腸菌内発現用プラスミドと適合してプラスミドを再構築した。この再構築プラスミドは pTH1 と命名されており、Trp プロモータの下流域において SD 配列から 10 塩基離れた位置から蛋白質合成が開始されるように

- 19 -

設計されている。従って、この発現用プラスミドを大腸菌等に導入した場合には、インドールアクリル酸 (IAA) 等での蛋白質の誘導が可能である。

尚、上記の再構築ベクターは制限酵素 BglII 及び BamHI の認識部位を有するように設計されている。

(3) モチリン様ポリペプチド遺伝子を 2 つ又はそれ以上包有している発現用プラスミドの構築

これについては第 2 図を参照されたい。先ず、上記の第 (2) 項で得たプラスミド (pTH1) を制限酵素 BclI 及び BamHI により処理してモチリン様ポリペプチド遺伝子部分の上流域とベクター内の 1 箇所を切断してフラグメントを回収した。次に、上記の第 (2) 項で得たプラスミドであって、切断処理した上記プラスミドとは別にプラスミド (pTH1) を制限酵素 BclI 及び BglII により処理してベクター内の上記箇所と同一の箇所及びモチリン様ポリペプチド遺伝子部分

- 20 -

の下流域が上記の上流域の断点と共通となるように切断し、その断点に上記の切断回収されたフラグメントを DNA リガーゼにより接合してプラスミドを再構築すれば、モチリン様ポリペプチド遺伝子を 2 つ包有している発現用プラスミド (pTH2) が得られる。この場合にモチリン様ポリペプチド遺伝子相互間は Gly-Ile-Phe-Met のペプチドで連結されている。

尚、上記の場合に、制限酵素 BamHI による断点と制限酵素 BglII による断点とが DNA リガーゼにより接合されるが、この接合部位は最早これら両酵素の切断認識部位ではなくなってしまう。従って、上記の切断及び接合操作を繰り返すことにより、モチリン様ポリペプチド遺伝子がタンデムに任意数結合され、その上流にメチオニンを介してリーダーペプチド配列を有しているプラスミドを得ることができる。

(4) モチリン様ポリペプチド含有融合蛋白質の生成

上記の第 (3) 項に記載のようにして調製さ

- 21 -

れた、タンデムに 4 つ連結されているモチリン様ポリペプチド遺伝子を包有しているプラスミド (pTH4) を大腸菌 (HB101) に取り込ませて形質変換菌を得た [これは工業技術院微生物工学技術研究所に国際寄託された (微生物系第 2555 号)]。この形質変換菌をアンピシリン 50 µg/ml 含有培養液 (例えば、M9 培地に 0.5% カザミノ酸を添加したもの) により星つエイブル社製の D 型ファーメンターを用いて 30℃ において通気培養した。A₅₅₀ が 0.6 - 0.8 になった時点でインドールアクリル酸 (IAA) を添加し、最終濃度を 15 µg/ml にした。

その後、16 時間培養を継続し、次いで遠心分離 (8000rpm, 4℃, 5 分間) により菌体を回収した。この菌体の一部を採取して SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (15%) にかけて分析した処、所望の融合蛋白は全蛋白の約 30% に濃縮していた。これは、プラスミドに組込まれた合成 DNA におけるリーダーペプチド配列部分が極めて効率良く翻訳の形成を促し、ヌプロテアーゼに

- 22 -

特開平 3-80096(7)

よる分解を殆ど受けないためであると推定された。

(5) モチリン様ポリペプチドの分離精製

上記の第(4)項で得られたペースト状固体(30ml 相当)を 200ml の冷アセトン中に懸濁させた後にガラスフィルターにて濾過し、残渣を生理食塩水 300ml 中に懸濁させ、高圧ホモジナイザー又は超音波処理することにより固体を破壊した。固体残渣を 10000rpm で 15 分間遠心処理してペレット化させた。このペレットはリーダーペプチドとモチリン様ポリペプチド 4 量体の融合蛋白を包有している。

従って、このペレット(蛋白量約 500mg)を 70% 硫酸溶液 30ml に溶解させ、この溶液にプロムシアン 500mg を添加し、30℃ の温度条件下において一晩反応させた。その後、NaOH 40g と蒸留水 200ml とを添加して pH を 3 以上にさせた後に遠心分離処理(1000rpm × 20 分)によって上清を回収し、セファデックス C-15 を用いた脱塩処理して硫酸及びプロムシアンを除去し、

-23-

モチリン様ポリペプチド抽出画分を陽イオン交換液クロマトグラフィーにて処理し、次いでウォーターズ社製のマイクロボンダスフェアの C-18 カラム(19mm × 15cm)を用い HPLC により以下の条件で精製した。

溶出液 : 0.1% トリフルオロ酢酸中 30% から 60% 迄のアセトニトリルの直線勾配、30 分間)

流速 : 7.0ml/min

HPLC によるメインピーク部分を回収して凍結乾燥させ、その一部を採取してアプライドバイオシステムズ社製のペプチドシーケンサーにより調べた所、全的に Hse を有する正しい配列のモチリン様ポリペプチドであることが確認された。

上記のように操作を行うことにより、大腸菌 1 リットルの培養で所望のモチリン様ポリペプチドを 400 - 500mg 得ることができた。

生理活性試験例(腸管収縮活性の測定)

上記の製造例で得られたモチリン様ポリペプチド(L-ロイシン-13-モチリン-ホモセリン)を被

-24-

験物質とし、合成法により得られた純モチリンを対照物質とし、ウサギ十二指肠を用いるマグヌス法["J. Pharm. Pharmac." 第 28 巻第 650 - 651 頁(1976 年)]に従い腸管収縮活性を測定した結果は第 3 図に示される通りであった。

この図から明らかなように、アセチルコリン(10^{-6} M)による収縮を 100% とした場合に、本発明により得られた L-ロイシン-13-モチリン-ホモセリンが示す腸管収縮活性は純モチリンと同レベル程度であることが確認された。
(発明の効果)

本発明によれば、モチリン様遺伝子のアミノ酸配列をコードする塩基配列を包含する DNA 断片が、分割して化学合成され、次いで結合させることにより、所望のものとして形成されるので、この DNA 断片の合成が比較的容易である。この DNA 断片においてモチリン様遺伝子をコードするアミノ酸配列の N 末端側にはメチオニンを介してリーダーペプチド配列が存在し、このモチリン様遺伝子含有 DNA 断片をベクターとしてのプ

-25-

ラスミドに組み込み且つ該プラスミドを微生物に取り込ませて培養する場合に、上記のリーダーペプチドがモチリン様活性物質の産生を促進するので生産効率が上昇する。

尚、上記のリーダーペプチド配列の後には、Met を介してモチリン様遺伝子をタンデムに複数個連結させることができ、このようにモチリン様遺伝子を複数回包有している DNA をプラスミドに組み込み且つ該プラスミドを微生物に取り込ませて培養すれば、当然のことながらモチリン様活性物質の発現率を著しく向上させることができる。

しかも、本発明方法によれば、精製処理がプロムシアンによる処理のみであるために極めて簡便である。

従って、本発明はモチリン様生理活性物質を廉価に且つ大量に生産することを可能にするものであり、術後における患者の腸管肝臓等に現在用いられており副作用が強いプロスタグランジン等に代わるべき安全な医薬品を提供するものである。

-26-

特開平 3-80096(8)

4. 図面の簡単な説明

第 1 図は本発明方法の要部を構成する、モチリン様遺伝子 1 つを包有する遺伝子組換えプラスミドの構築態様を示す説明図、第 2 図は第 1 図と同様の、但しモチリン様遺伝子を 2 つタンデムに包有する遺伝子組換えプラスミドの構築態様を示す説明図、第 3 図は本発明方法により製造された L-ロイシン-13-モチリン-ホモセリンと従来法により得られた純モチリンとの腸管収縮活性をマグナス法により測定した結果を示すグラフである。

特許出願人 株式会社 三和化学研究所

代理人 弁理士 佐々木 功



- 27 -

—706—